

Aus dem Immunologischen Forschungslabor
der Freien Universität Berlin
Klinikum Steglitz

Leiter: Professor Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein

VERGLEICH DER WIRKUNG EINIGER CORTICOIDE
AUF DIE HUMORALE ANTIKÖRPERBILDUNG BEI DER MAUS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gerhard Wilcke
aus Ruhla

1972

Aus dem Immunologischen Forschungslabor
der Freien Universität Berlin
Klinikum Steglitz

Leiter: Prof.Dr.rer.nat. Tibor Diamantstein

Vergleich der Wirkung einiger Corticoide
auf die humorale Antikörperbildung bei der Maus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gerhard Wilcke
aus Ruhla

Referent: Professor Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. Tibor Diamantstein
Korreferent: Professor Dr. med. Günter Stüttgen



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 24. April 1972

INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

1. Einleitung	3
2. Aufgabenstellung	5
3. Material und Methoden	6
3.1 Tiermaterial	6
3.2 Die verwendeten Corticoide	6
3.3 Immunisierung	6
3.4 Corticoidapplikation	6
3.5 Bestimmung der Antikörpertiter von mit SRBC immunisierten Mäusen	7
3.6 Statistische Analyse der Ergebnisse	8
4. Ergebnisse	9
4.1 Untersuchung des Einflusses von Corticosteron auf die Antikörperbildung	9
4.2 Untersuchung des Einflusses von Fluocortolon, Difluocortolon und Dexamethason auf die Anti- körperbildung in Abhängigkeit von der Anti- gendosis	11
4.3 Untersuchung des Einflusses des Zeitpunktes der Gabe von Corticoiden (Fluocortolon, Difluocortolon, Dexamethason) in Relation zum Zeitpunkt der Immunisierung der Tiere auf die AK-Titer	14
4.4 Vergleich der Dosiswirkungskurven von Fluocortolon, Difluocortolon, Hydrocortison und Dexamethason	24
4.5 Die Erholung der Milz- und Thymusgewichte nach Applikation von Fluocortolon, Difluocortolon und Dexamethason	28
5. Zusammenfassung	32
6. Literaturverzeichnis	35

1. EINLEITUNG

Corticoide haben als Antiphlogistika und als Immunsuppressiva eine breite Verwendung in der Medizin gefunden. Unseres Wissens nach stehen jedoch Untersuchungen aus, inwieweit diese beiden Eigenschaften notwendigerweise miteinander korreliert sind. Was die immunsuppressive Wirkung dieser Substanzen anbelangt, sind verschiedene Wirkungsmechanismen diskutiert worden.

DOUGHERTY und WHITE (9) sahen die Wirkungsweise in der Lymphocytolyse und Lymphokaryorhexis, MAKMAN et al. (18) in der Hemmung der RNS, DNS und Proteinsynthese in den lymphoiden Zellen; KASS et al. (15) in der Hemmung oder Verhinderung der Phagocytose in den lymphoiden Zellen; HECHTER und LESTER (14) in der Stabilisierung der Zellmembranen; WEISSMAN und THOMAS (24) in der Stabilisierung der subzellulären Membranen und GEWURZ (13) in einem antikomplementären Effekt. In neuerer Zeit wiesen besonders CRADDOCK (6) und DUKOR und DIETRICH (7) darauf hin, daß die Hemmung der Immunantwort durch Corticoide in der Beeinflussung der Präinduktionsphase liegen könnte.

Die antiphlogistische Wirkung ist intensiv untersucht worden (4, 23). Es zeigte sich dabei unter anderem, daß

durch entsprechende Substitution die von Corticosteron abgeleiteten Corticoide in ihrer antiphlogistischen Wirkung verändert werden können (5, 12, 17).

Ein Ähnliches ist auch bei Untersuchung der immunsuppressiven Wirkung von Corticoiden bekannt (19). Es erhob sich deswegen die Frage, inwieweit diese beiden Eigenschaften von Corticoiden miteinander korreliert sind, das heißt anders ausgedrückt: Ist ein Corticoidderivat mit starker immunsuppressiver Wirkung gleichzeitig auch ein starkes Antiphlogistikum oder sind diese beiden Eigenschaften partiell oder auch vielleicht vollständig voneinander zu trennen.

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN:

K	=	Kontrolle
CC	=	Corticosteron
HC	=	Hydrocortison
F	=	Fluocortolon
DF	=	Difluocortolon
D	=	Dexamethason
SRBC	=	Hammelerythrozyten
i.p.	=	intraperitoneal
AK	=	Antikörper
AG	=	Antigen

2. AUFGABENSTELLUNG

Um die Frage zu prüfen, inwieweit die antiphlogistische Wirkung von Corticoidderivaten mit ihrer immunsuppressiven Wirkung parallel geht, sollte der Einfluß von Corticosteron, Hydrocortison, Fluocortolon, Difluocortolon und Dexamethason auf die Immunantwort untersucht werden. Diese Substanzen haben in der angegebenen Reihenfolge ansteigende antiphlogistische Wirkung.

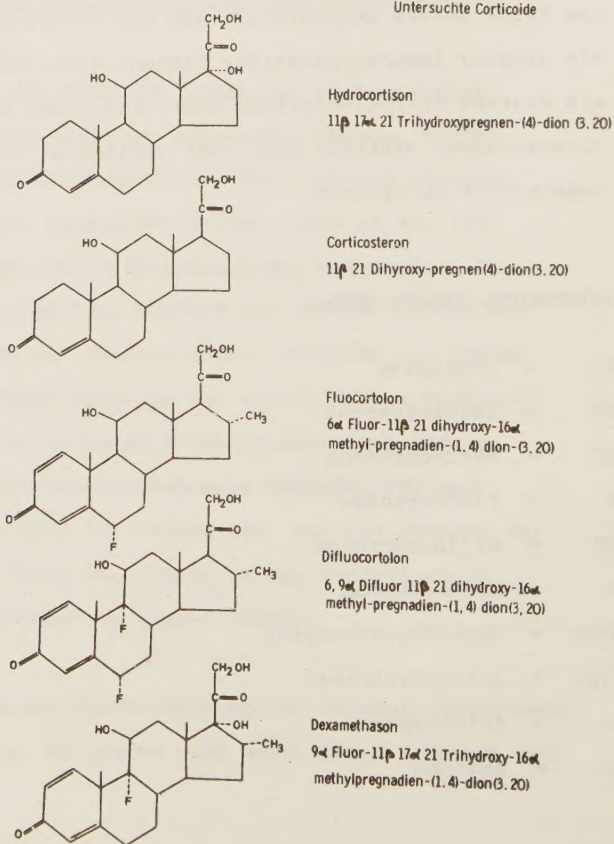


Abb. 1

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten 8-9 Wochen alte spf NMRI/Han. Mäuse aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover. Die Tiere wurden mit dem üblichen Altromin R 10 Standardfutter ernährt.

3.2 Die verwendeten Corticoide

Corticosteron, Hydrocortison, Fluocortolon, Difluocortolon und Dexamethason wurden von der Fa. Schering AG. Berlin freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.3 Immunisierung

Zur Immunisierung wurden konservierte Hammelerythrozyten der Behringwerke/Marburg benutzt. Die SRBC wurden nach dreimaligem Waschen mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung (0,15 m; pH 7,2) auf die benötigte Konzentration durch Auszählen im Häemocytometer eingestellt. Die Mäuse wurden i.p. mit 2×10^6 , 2×10^7 , 2×10^8 und 2×10^9 SRBC-Suspension in 0,5 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung immunisiert. In den meisten Versuchen sind die Tiere mit 2×10^9 SRBC immunisiert worden.

3.4 Corticoidapplikation

Die Corticoide sind in steriler NaCl-Lösung in einem

Volumen von 0,5 ml i.p. appliziert worden. Die Corticoidapplikation erfolgte, wie aus den entsprechenden Tabellen ersichtlich ist, in den meisten Fällen einen Tag vor der Immunisierung. In einer anderen Versuchsreihe wurde der Zeitpunkt der Corticoidgabe zum Zeitpunkt der Immunisierung variiert. In den meisten Versuchen sind 2,5 oder 5 mg des entsprechenden Corticoids verabreicht worden, abgesehen von dem Versuch, bei dem die Dosiswirkungskurve der verschiedenen Corticoide bestimmt wurde.

3.5 Bestimmung der Antikörpertiter von mit SRBC immunisierten Mäusen

Die Mäuse wurden zu den in den Tabellen gezeigten Zeitpunkten getötet und entblutet. Die Antikörpertiter sind in logarithmischer Serumverdünnung zur Basis 2 bestimmt worden. Die Seren sind vorher 30 min. bei 56° C zur Zerstörung des Eigenkomplements inkubiert worden. Als Verdünnungsflüssigkeit wurde sterile physiologische NaCl verwandt.

Nach SABET et al. (20) wurden für die Hämolyseintitration 0,2 ml einer Mischung aus gleichen Volumina 1%iger Hammelerythrozyten (SRBC) und 1:10 mit steriler physiologischer NaCl verdünntem Meerschweinchenkomplement (Behringwerke/Marburg) zu 0,2 ml Serumverdünnung hinzugefügt. Nach

Durchmischen der Proben wurden diese bei 37°C eine Stunde inkubiert. Als Titer wird die höchste Serumverdünnung bezeichnet, welche unter den Versuchsbedingungen eine vollständige Hämolyse der hinzugefügten Erythrocyten bewirkt.

Für die Hämagglutinintitration wurden die Seren, wie oben erwähnt, vorbereitet und verdünnt. Zu den entsprechenden Serumverdünnungen - 0,2 ml pro Reagenzglas - wurde 0,2 ml einer 0,5%igen SRBC Suspension hinzugefügt. Nach Durchmischen der Proben wurden diese 2 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Titer wird die höchste Serumverdünnung bezeichnet, welche am Boden des Reagenzglases ein Agglutinationsmuster 1+ oder mehr gezeigt hat, wie es bei STAVITSKY (22) beschrieben ist. Sowohl die für die Hämolysine als auch die für Hämagglutinine verwendete SRBC-Suspension wurde vorher 3 x mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen.

Bei den entsprechenden Versuchen sind die Thymus- und Milzgewichte registriert worden.

3.6 Statistische Analyse der Ergebnisse

Die statistische Auswertung und Signifikanzberechnung der $\log_2$ Titer der Hämolysine, der Hämagglutinine und der

Milz- und Thymusgewichte erfolgte nach dem MILCOXON Test (21).

4. ERGEBNISSE

4.1 Untersuchung des Einflusses von Corticosteron auf die Antikörperbildung

Da die auf ihre immunsuppressive Wirkung zu untersuchenden Corticoide Corticosteronabkömmlinge sind, sollte als erstes der Einfluß von Corticosteron selbst auf die Antikörperbildung bei der Maus untersucht werden. Eine Gruppe von Mäusen (28 Tiere) erhielt i.p. eine Suspension von 5 mg Corticosteron/Maus verabreicht. Eine andere Gruppe (28 Tiere) erhielt 20 mg Corticosteron-suspension i.p. 24 Stunden später erhielten beide Gruppen jeweils 2×10^9 SRBC i.p. Eine dritte Gruppe von Tieren (28 Tiere), welche als Kontrollgruppe geädert hat, erhielt zum selben Zeitpunkt wie die mit Corticosteron behandelten Tiere 2×10^9 SRBC.

UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON CORTICOSTERON AUF DIE ANTIKÖRPERBILDUNG

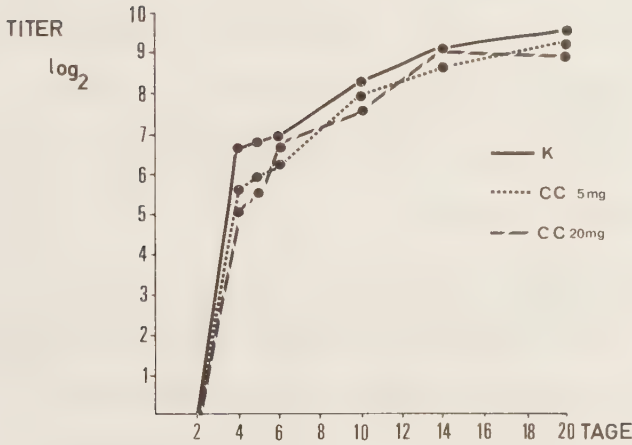


Abb. 2: Drei Gruppen von Mäusen wurden mit 2×10^9 SRBC immunisiert. Die Corticoidapplikation erfolgte einen Tag vor Immunisierung. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Hämagglutinititer von vier Tieren dar.

K = Kontrolle, CC = Corticosteron.

Wie aus Abb. 2 ersichtlich ist, sind am 2., 4., 5., 6., 10., 14. und 20. Tag nach Immunisierung aus jeder Gruppe jeweils 4 Tiere getötet und entblutet worden. In den Seren ist anschließend der gegen die Hammelerythrocyten gerichtete agglutinierende AK-Titer, wie es im methodischen Teil im einzelnen beschrieben ist, bestimmt worden. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, konnte zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied im Hämagglutinititer zwischen den mit Corticosteron behandelten und den Kontrolltieren festgestellt werden.

4.2 Untersuchung des Einflusses von Fluocortolon, Difluocortolon und Dexamethason auf die Antikörperbildung in Abhängigkeit von der Antigendosis

Nach DUKOR und DIETRICH (10) hemmt Hydrocortisonacetat die AK-Bildung bei der Maus gegen SRBC stärker bei niedrigen AG-Dosen als bei hohen AG-Dosen. Nachdem in Vorversuchen festgestellt wurde, daß Dexamethason und Difluocortolon einen Tag vor AG verabreicht, bei einer Dosis von 2,5 mg/Maus die AK-Bildung gegen SRBC, sowohl wenn man die Hämolyse- als auch die Hämagglutinititer betrachtet, stark hemmt, wurde der Einfluß von 2,5 mg Fluocortolon, Difluocortolon und Dexamethason auf die AK-Bildung bei verschiedenen AG-Dosen untersucht.

Gruppe 1 erhielt 2×10^6 , Gruppe 2 2×10^7 , Gruppe 3 2×10^8 , Gruppe 4 2×10^9 SRBC.

Tiere der entsprechenden Gruppen (1-4) wurden in vier Untergruppen (a-d) zu je 5-12 Tieren aufgeteilt. Tiere der Untergruppen 1-4 a wurden mit Fluocortolon, der Untergruppen 1-4 b mit Difluocortolon, der Untergruppen 1-4 c mit Dexamethason behandelt. Die Tiere der Untergruppen 1-4 d dienten dabei als Kontrolle. Die Corticoide (2,5 mg/Maus) wurden jeweils 1 Stunde vor Immunisierung den Tieren injiziert. 15 Tage nach Immunisierung wurden in den Seren die Hämagglutinin- und Hämolysintiter bestimmt.

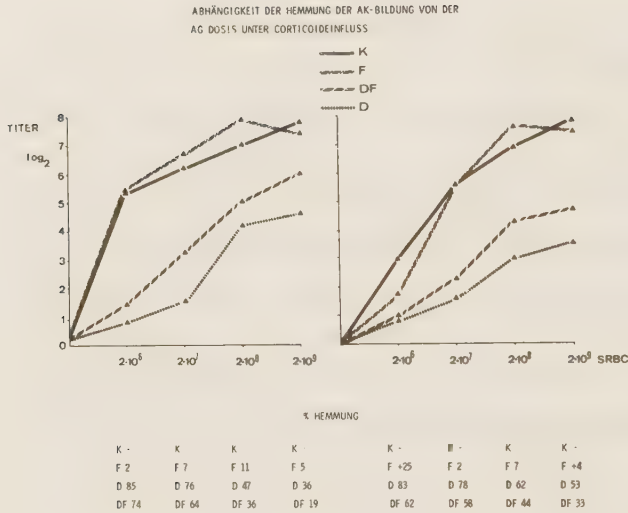


Abb. 3: Vier Gruppen von Mäusen sind jeweils mit unterschiedlichen Dosen von SREC immunisiert worden. Die Corticoidapplikation (2,5 mg/Maus) erfolgte eine Stunde vor Immunisierung. Die Hämolysintiter (links) und die Hämagglutinititer (rechts) wurden 15 Tage nach Immunisierung bestimmt. Die prozentuale Hemmung bzw. Stimulierung der Hämolysin- und der Hämagglutinititer bezogen auf die Kontrolltiter = 100 sind unterhalb der Abb. angegeben.

K = Kontrolle, F = Fluocortolon, DF = Difluocortolon, D = Dexamethason.

Wie aus Abb. 3 hervorgeht, sind bei dieser Dosierung nur Dexamethason und Difluocortolon immunsuppressiv wirksam. Fluocortolon hat keine signifikante Wirkung auf die AK-Bildung. In Übereinstimmung mit den Angaben von DIETRICH und DUKOR (7) zeigt sich, daß nicht nur Hydrocortisonacetat die AK-Bildung bei niedriger AG-Dosis stärker hemmt als bei höherer AG-Dosis, sondern daß dies ein charakteristisches Merkmal von Corticoiden im allgemeinen ist.

Wie aus Abb. 4 hervorgeht, sind auch die Thymus- und Milzgewichte gegenüber den Kontrollen relativ stärker reduziert bei Tieren, die mit einer niedrigen AG-Dosis immunisiert wurden, als bei Tieren, die mit einer höheren AG-Dosis immunisiert wurden. Es ist bemerkenswert, daß auch hier kein Unterschied zwischen mit Fluocortolon behandelten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe festzustellen ist.

4.3 Untersuchung des Einflusses des Zeitpunktes der Gabe von Corticoiden (Fluocortolon, Difluocortolon, Dexamethason) in Relation zum Zeitpunkt der Immunisierung der Tiere auf die AK-Titer

Nach BERGLUND (1, 3) hemmt Cortisonacetat die frühe AK-Bildung viel effektiver, wenn dieses Corticoid einige

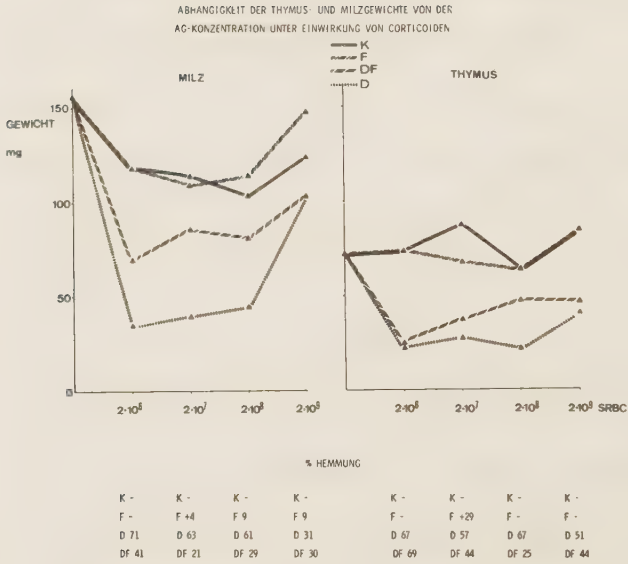


Abb. 4: Vier Gruppen von Mäusen sind jeweils mit unterschiedlichen Mengen von SRBC immunisiert worden. Die Corticoidapplikation erfolgte eine Stunde vor Immunisierung. Die Milz- und Thymusgewichte wurden 15 Tage nach Immunisierung bestimmt. Die prozentuale Hemmung bzw. Stimulierung (K = 100) der Milz- und Thymusgewichte sind unterhalb der Abb. angegeben.

K = Kontrolle, F = Fluocortolon, DF = Difluocortolon, D = Dexamethason.

Zeit vor AG-Gabe appliziert wird. Ähnliche Ergebnisse sind auch von ELLIOT und SINCLAIR (11) berichtet worden. Auch nach DIETRICH und DUKOR (7) führt die Applikation von Cortisonacetat kurz vor der AG-Gabe zu einer langanhaltenden Erniedrigung der Agglutinin-titer von mit SRBC immunisierten Tieren.

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluß von Fluocortolon, Difluocortolon und Dexamethason auf die Hämagglutinin-titer von mit SRBC immunisierten Tieren untersucht, wobei der Zeitpunkt der Behandlung der Tiere mit Corticoiden in Relation zum Zeitpunkt der Immunisierung variiert wurde. Es wurde in folgender Versuchsanordnung gearbeitet:

Experiment 1:

Mäuse sind in 4 Gruppen (1-4) zu 4-8 Tieren eingeteilt worden. Tiere der Gruppe 2 wurden mit Fluocortolon, Tiere der Gruppe 3 mit Difluocortolon, und Tiere der Gruppe 4 wurden mit Dexamethason behandelt. Die Corticoidapplikation (2,5 mg/Maus) erfolgte dabei, wie aus Abb. 5 ersichtlich ist, zu unterschiedlichen Zeiten: vor, gleichzeitig oder nach der Immunisierung der Tiere. Unter gleichen Bedingungen immunisierte, jedoch nicht behandelte Tiere (Gruppe 1), dienten dabei als Kontrolle. Die Hämagglutinin-titerbestimmung erfolgte in diesem Experiment 30 Tage nach Immunisierung.

ABHÄNGIGKEIT DER HEMMUNG DER AK BILDUNG VOM ZEITPUNKT DER
CORTICOIDGABE IN RELATION ZUM ZEITPUNKT DER AG-APPLIKATION

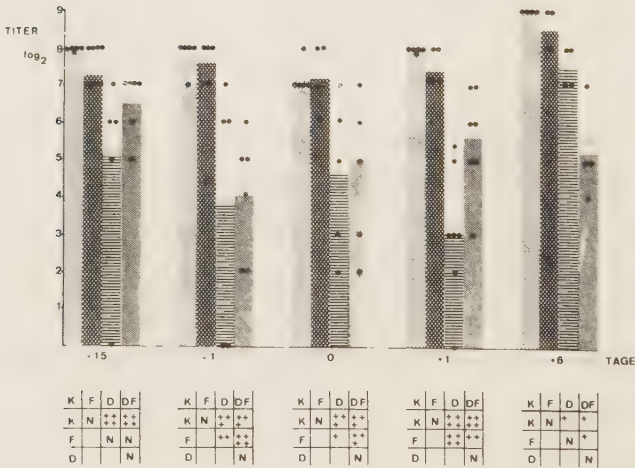


Abb. 5: Fünf Gruppen von Mäusen wurden mit 2×10^9 SPBC immunisiert (Tag der AG-Gabe = Tag 0). Die jeweilige Corticoidapplikation (2,5 mg/Maus) erfolgte an den oben angegebenen Tagen in Relation zum Zeitpunkt der AG-Applikation.

K = Kontrolle, F = Fluocortolon, D = Dexamethason, DF = Difluocortolon.

Die Agglutinititer wurden 30 Tage nach Immunisierung bestimmt. Unterhalb der Säulengruppen befinden sich die dazugehörigen Signifikanzberechnungen nach dem WILCOXON-Test.

N = nicht signifikant, + = $p < 0,1$ ++ = $p < 0,05$ +++ = $p < 0,02$ ++++ = $p < 0,01$.

Experiment 2:

Mäuse sind in 4 Gruppen (1-4) zu 4-6 Tieren eingeteilt worden. Tiere der Gruppe 2 wurden mit Fluocortolon, Tiere der Gruppe 3 wurden mit Difluocortolon und Tiere der Gruppe 4 mit Dexamethason behandelt. Die Corticoidapplikation (2,5 mg/Maus) erfolgte dabei, wie aus Abb. 6 ersichtlich ist, zu unterschiedlichen Zeiten: vor, gleichzeitig oder nach der Immunisierung der Tiere. Unter gleichen Bedingungen immunisierte, jedoch nicht behandelte Tiere (Gruppe 1), dienten dabei als Kontrolle. Die Bestimmung der Hämagglutinin-titer erfolgte in diesem Experiment 15 Tage nach Immunisierung.

Experiment 3:

Mäuse sind in 4 Gruppen (1-4) zu 7-12 Tieren eingeteilt worden. Tiere der Gruppe 2 wurden mit Fluocortolon, Tiere der Gruppe 3 mit Difluocortolon, und Tiere der Gruppe 4 wurden mit Dexamethason behandelt. Die Corticoidapplikation (5 mg/Maus) erfolgte dabei, wie aus Abb. 7 ersichtlich ist, zu unterschiedlichen Zeiten: vor, gleichzeitig oder nach der Immunisierung der Tiere. Unter gleichen Bedingungen immunisierte, jedoch nicht behandelte Tiere (Gruppe 1), dienten dabei als Kontrolle. Die Hämagglutinin-titerbestimmung erfolgte in diesem Experiment 30 Tage nach Immunisierung.

ABHÄNGIGKEIT DER HEMMUNG DER AK-BILDUNG VOM ZEITPUNKT DER
CORTICOIDGABE IN RELATION ZUM ZEITPUNKT DER AG-APPLIKATION

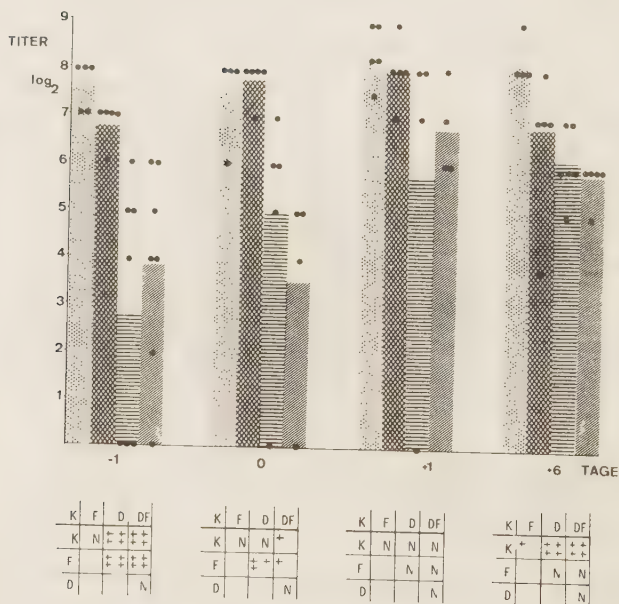


Abb. 6: Fünf Gruppen von Mäusen wurden mit 2×10^9 SRBC immunisiert (Tag der AG-Gabe = Tag 0). Die jeweilige Corticoidapplikation (2,5 mg/Maus) erfolgte an den oben angegebenen Tagen in Relation zum Zeitpunkt der AG-Applikation.

K = Kontrolle, F = Fluocortolon, D = Dexamethason, DF = Difluocortolon.

Die Agglutinititer wurden 15 Tage nach Immunisierung bestimmt. Unterhalb der Säulengruppen befinden sich die Signifikanzberechnungen nach dem Wilcoxon-Test. N = nicht signifikant, + = $p < 0,1$, ++ = $p < 0,05$, +++ = $p < 0,02$, ++++ = $p < 0,01$

ABHÄNGIGKEIT DER HEMMUNG DER AK-BILDUNG VOM ZEITPUNKT DER
CORTICOIDGABE IN RELATION ZUM ZEITPUNKT DER AG-APPLIKATION

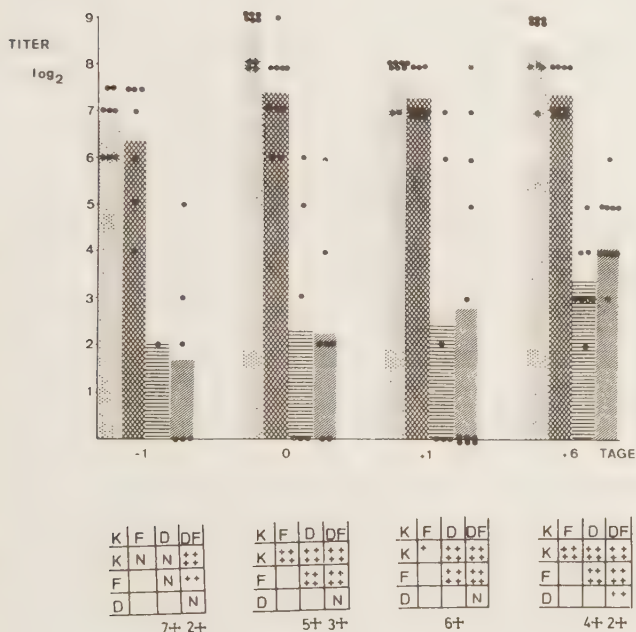


Abb. 7: Vier Gruppen von Mäusen wurden mit 2×10^9 SPBC immunisiert (Tag der AG-Gabe = Tag 0). Die jeweilige Corticoidapplikation (5 mg/Maus) erfolgte an den oben angegebenen Tagen in Relation zum Zeitpunkt der AG-Applikation.

K = Kontrolle, F = Fluocortolon, D = Dexamethason, DF = Difluocortolon.

Die Agglutinititer wurden 30 Tage nach Immunisierung bestimmt. Unterhalb der Säulengruppen befinden sich die dazugehörigen Signifikanzberechnungen nach dem WILCOXON-Test. N = nicht signifikant, + = $p < 0,1$, ++ = $p < 0,05$, +++ = $p < 0,02$, ++++ = $p < 0,01$.

Die Zahlen neben + geben die Anzahl der während des Versuches verstorbenen Tiere an.

Experiment 4:

Mäuse sind in 4 Gruppen (1-4), zu 8-13 Tieren eingeteilt worden. Tiere der Gruppe 2 wurden mit Fluocortolon, Tiere der Gruppe 3 mit Difluocortolon und Tiere der Gruppe 4 mit Dexamethason behandelt. Die Corticoidapplikation (5 mg/Maus) erfolgte dabei, wie aus Abb. 8 ersichtlich ist, zu unterschiedlichen Zeiten: vor, gleichzeitig oder nach Immunisierung der Tiere. Unter gleichen Bedingungen immunisierte, jedoch nicht behandelte Tiere (Gruppe 1), dienten dabei als Kontrolle. Die Bestimmung der Hämaagglutinititer erfolgte in diesem Experiment 15 Tage nach Immunisierung.

Wie aus Abb. 5 ersichtlich ist, hemmen Dexamethason und Difluocortolon die AK-Bildung signifikant, unabhängig davon, zu welchem Zeitpunkt sie in Relation zum Zeitpunkt der Immunisierung verabreicht wurden. Eine optimale Hemmung der AK-Bildung wurde dann erzielt, wenn diese Corticoide einen Tag vor AG-Gabe verabreicht wurden. Einen Tag nach AG-Gabe verabreichte Corticoide hemmten dagegen die AK-Bildung nicht signifikant, wenn man die frühe AK-Bildung (15 Tage nach Immunisierung) gemessen hat. Diese Ergebnisse stimmen im wesentlichen mit den von DUKOR und DIETRICH (10) beobachteten Effekten von Cortisonacetat auf die späte respective auf die frühe AK-Bildung überein. Wie aus Abb. 5

weiterhin hervorgeht, hemmten Difluocortolon und Dexamethason die frühe AK-Bildung auch dann, wenn sie 6 Tage nach Immunisierung verabreicht wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden von ELLIOT und SINCLAIR (11) mit Cortisonacetat beobachtet. Dagegen konnte unter keiner der hier angewandten Bedingungen eine signifikante Hemmung der AK-Bildung durch Fluocortolon beobachtet werden. Bei höherer Dosierung (5 mg/Maus) konnte eine Immunsuppression auch durch Fluocortolon erreicht werden, wenn man dieses Corticoid gleichzeitig mit dem Antigen oder 1 bzw. 6 Tage nach dem Antigen verabreichte (Abb. 7). Dieser Effekt konnte allerdings nur bei der späten AK-Bildung beobachtet werden. Gleichzeitig oder nach AG-Gabe verabreichtes Fluocortolon war bei dieser Dosierung nicht in der Lage, die frühe AK-Bildung signifikant zu beeinflussen (Abb. 8). Wie aus Abb. 7 und 8 weiterhin ersichtlich wird, ist die immunsuppressive Wirkung von Difluocortolon und Dexamethason nicht signifikant unterschiedlich. Dexamethason scheint jedoch wesentlich toxischer zu sein als Difluocortolon (Abb. 7).

ABHÄNGIGKEIT DER HEMMUNG DER AK-BILDUNG VOM ZEITPUNKT DER
CORTICOIDGABE IN RELATION ZUM ZEITPUNKT DER AG-APPLIKATION

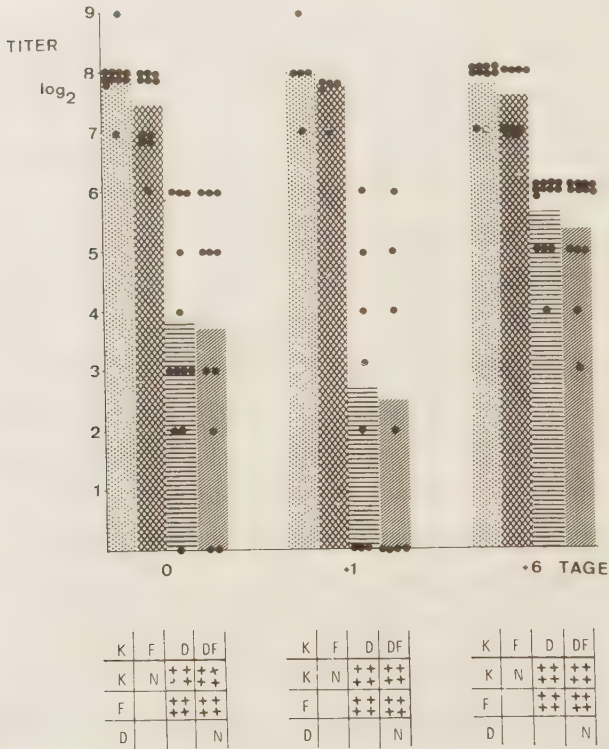


Abb. 8: Drei Gruppen von Mäusen wurden mit 2×10^9 SRBC immunisiert (Tag der AG-Gabe = Tag 0). Die jeweilige Corticoidapplikation (5 mg/maus) erfolgte an den oben angegebenen Tagen in Relation zum Zeitpunkt der AG-Applikation.

K = Kontrolle, F = Fluocortolon, D = Dexamethason, DF = Difluocortolon.

Die Agglutinititer wurden 15 Tage nach Immunisierung bestimmt. Unterhalb der Säulengruppen befinden sich die dazugehörigen Signifikanzberechnungen nach dem WILCOXON-Test.

N = nicht signifikant, + = $p < 0,1$, ++ = $p < 0,05$, +++ = $p < 0,02$, ++++ = $p < 0,01$.

4.4 Vergleich der Dosiswirkungskurven von Fluocortolon, Difluocortolon, Hydrocortison und Dexamethason

Um die immunsuppressive Wirkung der zu untersuchenden Corticoide miteinander vergleichen zu können, sind die Dosiswirkungskurven der betreffenden Corticoide bestimmt worden. Jeweils 3 Gruppen von Mäusen (8 Tiere/Gruppe) erhielten einen Tag vor der Immunisierung steigende Dosen des betreffenden Corticoids. Die Tiere sind mit 2×10^9 SRBC immunisiert worden. Als Kontrolle dienten Tiere, die mit 2×10^9 SRBC immunisiert wurden.

Fluocortolon und Hydrocortison wurde in einem Dosishereich von 2,5 - 20 mg/Maus und Difluocortolon und Dexamethason in einem Dosishereich von 0,1 - 2,5 mg/Maus geprüft. In diesem Experiment sind sowohl die Hämolyisin- als auch die Hämagglutininintiter 15 Tage nach Immunisierung bestimmt worden.

Wie der Vergleich der Dosiswirkungskurven von Hydrocortison, Fluocortolon, Dexamethason und Difluocortolon zeigt, ist Fluocortolon lediglich in einem von Hydrocortison nicht unterscheidbaren Ausmaß schwach immunsuppressiv wirksam. Diese Feststellung trifft sowohl für den Einfluß dieser Corticoide auf die Hämolyisin- als auch auf die Hämagglutininintiter zu.

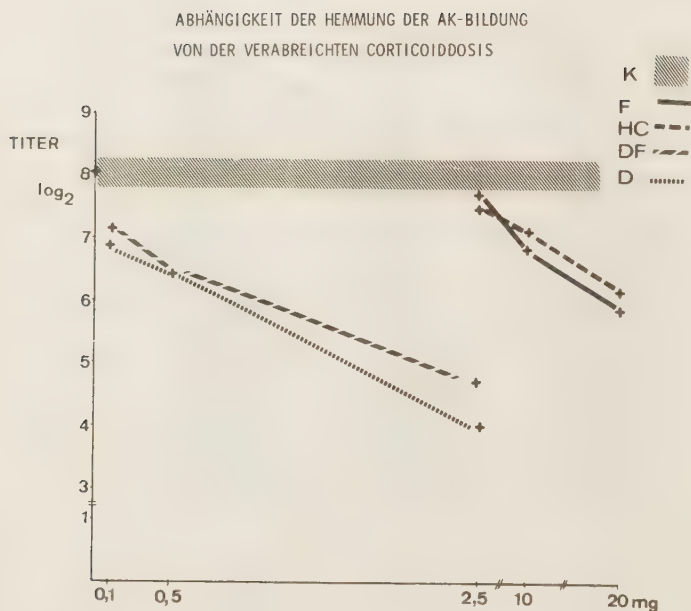


Abb. 9: Fünf Gruppen von Mäusen sind jeweils mit 2×10^9 SRBC immunisiert worden. Die Corticoidapplikation erfolgte 24 Stunden vor Immunisierung.

K = Kontrolle, F = Fluocortolon, D = Dexamethason, DF = Difluocortolon.

Jeder Punkt stellt den Mittelwert von 8 Tieren dar. Die Hämagglutinititer wurden 15 Tage nach Immunisierung bestimmt. Auf der Abszisse sind die Corticoiddosen angegeben.

Betrachtet man die Hemmung der AK-Bildung durch Dexamethason und Difluocortolon anhand der Hämolyisin- und der Hämagglutininintiter, so lassen sich zwischen diesen zwei stark immunsuppressiven Substanzen keine signifikanten Unterschiede feststellen. Nachdem Fluocortolon etwa 10 x antiphlogistisch wirksamer ist als Prednisolon (12, 16) und dieses wiederum stärker ist als Hydrocortison, dagegen aber keine Unterschiede in der immunsuppressiven Wirkung beider Substanzen festzustellen waren, besteht die Möglichkeit, daß hier eine partielle Dissoziation der immunsuppressiven Eigenschaften eines Corticoids von seinen antiphlogistischen vorliegt. Es ist bemerkenswert, daß Fluocortolon (12) dennoch bei der Behandlung von Autoaggressionskrankheiten erfolgreich eingesetzt werden kann.

Die Diskrepanz zwischen der in dieser Arbeit beschriebenen schwachen immunsuppressiven Wirkung von Fluocortolon und den therapeutischen Erfolgen bei der Behandlung von Autoaggressionskrankheiten durch Fluocortolon lassen verschiedene Deutungsmöglichkeiten zu.

Die eine Möglichkeit wäre, daß Fluocortolon bevorzugt die Ausbildung einer zellulären Immunität zu verhindern vermag, die in dieser Arbeit nicht gemessen wurden.

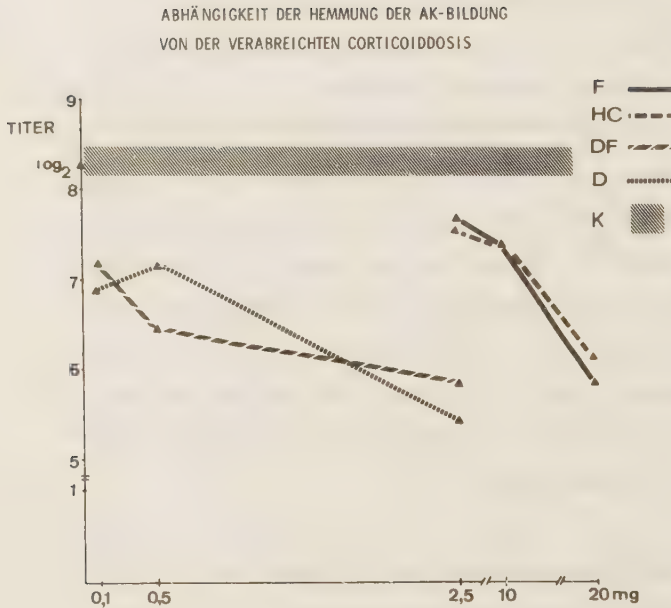


Abb. 10: Fünf Gruppen von Mäusen sind jeweils mit 2×10^9 SRBC immunisiert worden. Die Corticoidanplikation erfolgte 24 Stunden vor Immunisierung.

K = Kontrolle, F = Fluocortolon, D = Dexamethason, DF = Difluocortolon, HC = Hydrocortison.

Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Hämolyseantiter von 8 Tieren dar. Die Hämolyseantiter wurden 15 Tage nach Immunisierung bestimmt. Auf der Abszisse sind die Corticoiddosen angegeben.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß Fluocortolon aufgrund seiner antiphlogistischen Wirkung auf den afferenten Schenkel ein durch eine AG-AK-Reaktion ausgelöstes Immunphänomen bevorzugt hemmt, ohne die der Reaktion zugrundeliegende Antikörperbildung wesentlich zu beeinflussen.

4.5 Die Erholung der Milz- und Thymusgewichte nach Applikation von Fluocortolon, Difluocortolon und Dexamethason

In einer Versuchsreihe ist der Einfluß von Fluocortolon, Difluocortolon und Dexamethason auf die Milz- und Thymusgewichte untersucht worden. Wie aus Abb. 11 und 12 hervorgeht, kommt es bei einmaliger Verabreichung von 2,5 mg Corticoid/Maus zu einer Milz- und Thymusinvolution, die je nach verwendetem Corticoid unterschiedlich stark ausgeprägt ist und sich nach unterschiedlichen Zeiten regeneriert.

Es ist auffällig, daß Fluocortolon 9 Tage nach Applikation zu einer Abnahme sowohl der Thymus- als auch der Milzgewichte führt. Betrachtet man die Thymus- und Milzgewichte 24 Tage später, so kommt es zu einer Überkompensation und dann am 30. Tag zu einer Normalisierung der Gewichte. Am nachhaltigsten ist die Wirkung von Dexamethason. Hier erholen sich die Thymus- und Milzgewichte praktisch

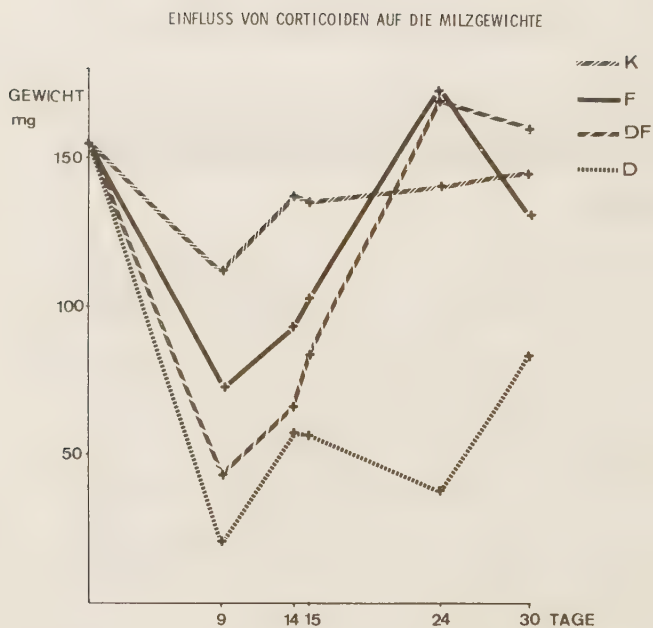


Abb. 11: Erholung der Milzgewichte nach einmaliger Gabe von 2,5 mg Corticoid.
K = Kontrolle, F = Fluocortolon, D = Dexamethason, DF = Difluocortolon.
Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert der Milzgewichte von 8 Tieren.

EINFLUSS VON CORTICOIDEN AUF DIE THYMUSGEWICHTE

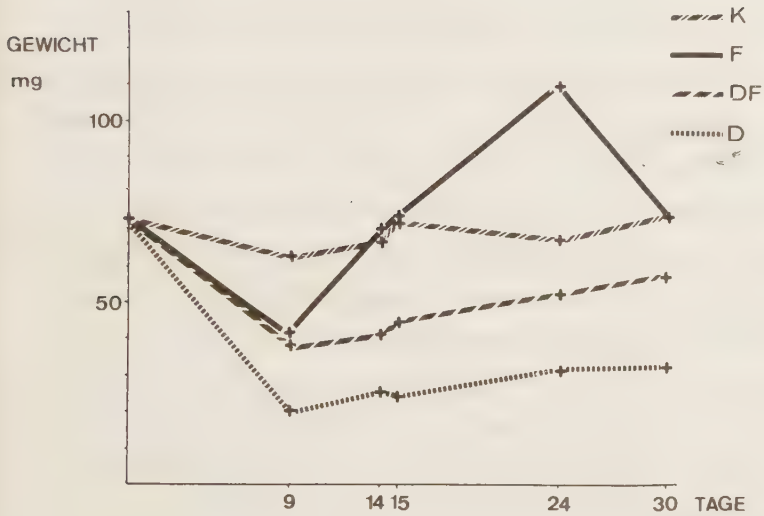


Abb. 12: Erholung der Thymusgewichte nach einmaliger Gabe von 2,5 mg Corticoid.

K = Kontrolle, F = Fluocortolon, D = Dexamethason, DF = Difluocortolon.

Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert der Thymusgewichte von 8 Tieren.

innerhalb des gemessenen Zeitraumes von 30 Tagen nicht. Bei Behandlung der Tiere mit Difluocortolon sind die Thymusgewichte zwar am 9. Tag etwa mit denen der mit Fluocortolon behandelten Tiere vergleichbar erniedrigt, erholen sich aber langsam, jedoch nicht vollständig, innerhalb von 30 Tagen. Dagegen erholen sich die Milzgewichte der mit Difluocortolon behandelten Tiere wesentlich schneller, und auch hier ist eine Überkompensation am 24. Tag feststellbar. Wie aus Tabelle 7 zu ersehen ist, scheint Difluocortolon weniger toxisch zu sein als Dexamethason. Dieser Befund scheint korreliert zu sein mit der schnellen Erholung von Milz- und Thymusgewichten der mit Difluocortolon behandelten Tiere gegenüber den mit Dexamethason behandelten Tieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die immunsuppressive Wirkung von Corticosteron, Hydrocortison, Fluocortolon, Difluocortolon und Dexamethason miteinander verglichen. Die Versuche sind an mit SRBC immunisierten Mäusen durchgeführt worden. Es sind dabei die Hämolysin- und Hämagglutininintiter 15 bzw. 30 Tage nach Immunisierung bestimmt worden. In Übereinstimmung mit der Literatur zeigte sich, daß auch die hier untersuchten Corticoide abgesehen von Corticosteron, welches bei den untersuchten Dosierungen keine Wirkung auf die AK-Bildung hatte, am stärksten immunsuppressiv wirksam waren, wenn sie einen Tag vor Immunisierung verabreicht wurden. Eine Hemmung der AK-Bildung ließ sich auch dann feststellen, wenn man diese Corticoide zu verschiedenen Zeitpunkten nach AG-Gabe verabreicht hat. Nach AG-Gabe verabreichte Corticoide hemmten die späte AK-Bildung stärker als die frühe AK-Bildung. Die Wirkung der Corticoide ist zudem von der zur Immunisierung verwendeten AG-Dosis abhängig. Corticoide hemmten die AK-Bildung bei mit niedrigen AG-Dosen immunisierten Mäusen relativ stärker als bei Mäusen, die mit hohen AG-Dosen immunisiert wurden. Dies scheint ein Charakteristikum von Corticoiden zu sein.

Wie die Dosierungswirkungskurven zeigten, ist Fluocortolon

lediglich in einem mit Hydrocortison vergleichbaren
Zusatz immunsuppressiv wirksam.

Dexamethason ist toxischer als Difluocortolon, und der
Einfluß von Dexamethason ist auf Milz und Thymus ausge-
prägter und länger anhaltend als der von Difluocortolon.
Die immunsuppressiven Wirkungen von Difluocortolon und
Dexamethason sind dagegen nicht signifikant voneinander
unterschiedlich.

Da Fluocortolon mehr als 10 x stärker antiphlogistisch
wirksam ist als das hier zum Vergleich verwendete Hydro-
cortison (12), scheint eine partielle Dissoziation der
antiphlogistischen Wirkung eines Corticoids von seiner
immunsuppressiven Wirkung möglich zu sein. Um die Frage
zu klären, ob hier tatsächlich eine partielle Dissoziation
der immunsuppressiven Wirkung von der antiphlogistischen
Wirkung vorliegt, wie es nach den vorliegenden Ergebnissen
zu sein scheint, müßten quantitative Werte über die
antiphlogistische Wirkung der untersuchten Substanzen vor-
liegen. Unseres Wissens nach gibt es jedoch keine Unter-
suchungen, die mit den von uns verwendeten Corticoiden
unter vergleichbaren Bedingungen in Hinblick auf ihre
antiphlogistische Wirkung durchgeführt wurden. Diese Tatsache
schränkt die Aussagefähigkeit unserer Ergebnisse ein. Es

müßte ferner der Einfluß unterschiedlicher Applikationsarten auf die Immunsuppression und die antiphlogistische Wirkung der Präparate überprüft werden. Zudem blieben hier die Untersuchungen auf die humorale AK-Bildung beschränkt. Um ein vollständiges Bild zu erhalten, sollte der Einfluß der untersuchten Substanzen auf die zelluläre Immunität, die unseres Wissens nach systematisch noch nicht erfolgt ist, mit berücksichtigt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. BERGLUND, K.: Studies on factors which condition the effect of cortisone on antibody production. 1. The significance of time of hormone administration in primary hemolysin response. Acta path. microbiol. scand. 38: 311 (1956 a)
2. BERGLUND, K.: Studies on factors which condition the effect of cortisone on antibody. 2. The significance of the dose of antigen in primary hemolysin response. Acta path. microbiol. scand. 38: 329 (1956 b)
3. BERGLUND, K.: Studies on factors which condition the effect of cortisone on antibody production. 3. The significance of time of hormone administration in primary agglutinin response to S. thyphi H. Acta path. microbiol. scand. 38: 403 (1956 c)
4. BHARGAVA, A.S.: Effect of antiinflammatory agents on adjuvant-induced edema modified for primary test. Pharmacol. Res. Commun. 3: 83 (1971)
5. BIGGS, M.H., : Steroid Biochemistry and Pharmacology
BROTHERTON, J. Academic Press, London and New York
147 (1970)
6. CRADDOCK, C.G., : The immune response to foreign red
WINKELSTEIN, A., blood cells and the participation of
MATSUYUKI, Y. and short-lived lymphocytes. J. exp.
LAWRENCE, J.S. Med. 125: 1149 (1967)

7. DIETRICH, F.M., : The immune response to heterologous
DUKOR, P. red cells in mice. 2. Antibody
formation to red cells from species
taxonomically related to sheep or
mouse.
Immunology, Lond. 13: 585 (1967 a)
8. DOUGHERTY, T.F.: Lymphocytokaryorrhectic effects of
adrenalcortical steroids; in
REBUCK's The lymphocyte and lymphatic
tissue, pp. 112. (HOEBER, New York
1960)
9. DOUGHERTY, T.F.: Functional alterations in lymphoid
and WHITE, A. tissue induced by adrenal cortical
secretion. Amer.J.Anst. 77: 81 (1945)
10. DUKOR, P., : Characteristic features of immun-
DIETRICH, F.M. suppression by steroids and cyto-
toxic drugs. Int.Arch. Allergy 34:
32 (1968)
11. ELLIOT, E.V., : Effect of cortisone acetate on 19 S
SINCLAIR, N.R.ST.C. and 7 S haemolysin antibody.
Immunology, 15: 643 (1968)
12. GARN, W., HERMS, E.: Fluocortolon-Symposion Berlin 1967
MATTHES, H. Saladruck. Berlin 1967
13. GEWURZ, H., : Effect of hydrocortisone succinate
WERNICK, P.R., on the complement system. Nature,
QUIF, P.G., GOOD, Lond. 208: 755 (1965)
R.A.
14. HECHTER, O. and: Cell permeability and hormone
LESTER, G. action. Recent Progr. Hormone
Res. 16: 139 (1960)

15. KASS, E.H., : Effect of certain corticosteroids
KENDRICK, M.J. and and of growth hormone on nucleo-
FINLAND, M. proteins in lymph nodes. Ann. N.Y.
Acad. Sci. 56: 737 (1953)
16. KUSCHINSKY, G.,: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie
LÜLLMANN, H. Thieme Verlag 3. Auflage (1967)
17. LERNER, L., : Comparison of anti-granuloma,
TURKHEIMER, A., thymolytic and glucocorticoid
BIANCHI, A., SINGER, activities of anti-inflammatory
F., BORMAN, A. steroids. Proc. soc. exp. Biol.
116: 385 (1964)
18. MAKMAN, M.H. : Studies of the mode of action of
NAKAGAWA, S. and adrenal steroids on lymphocytes.
WHITE, A. Recent Progr. Hormone Res. 23:
195 (1967)
19. NEWSOM, S.E. and: A comparison of the effects of certain
DARRACH, N. corticosteroids and related compounds
on the production of circulating
hemolytic antibodies in the mouse.
1. Structural variations at C-11
and C-17. Canad. J. Biochem. Physiol. 34: 1 (1956)
20. SABET, T., NEWLIN,: Effects of "blockade" on antibody-
C., FRIEDMAN, H. formation, Immunology, 16: 433 (1969)
21. SACHS, L.: Statistische Auswertungsmethoden
SPRINGER, Berlin, Heidelberg, 312
(1968)
22. STAVITSKY, A.B.: Micromethods for the study of
proteins and antibodies, J.Immunol.
72: 360 (1954)

23. TONELLI, G.,:
THIBAUT, L.,
RINGLER, I. A bio-assay for the concomitant
assessment of the antiphlogistic
and thymolytic activities of
topically applied corticoids.
Endocrinology Vol. 77 No. 4: 625
(1965)
24. WEISSMANN, G.,:
THOMAS, L. Studies on lysosomes. 2. The effect
of cortisone on the release of acid
hydrolases of a large granule fraction
of rabbit liver induced by an excess of
vitamin A. J. clin. Invest. 42: 661
(1963)

Herrn Professor Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein,
unter dessen Leitung auch die vorliegende Dissertation
angefertigt wurde, danke ich für die Überlassung des
Themas.

LEBENS LAUF

Am 20.9.1943 wurde ich als Sohn des praktischen Arztes Karl Rudolf Wilcke und seiner Ehefrau Anneliese Wilcke geb. Stechern in Ruhla in Thüringen geboren.

Nach unserer Umsiedlung 1952 besuchte ich in Berlin die weiterführenden Schulen und bestand hier im Frühjahr 1963 das Abitur.

Mein Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1963 an der Freien Universität Berlin und legte dort 1964 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1965 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach einem Semester an der Medizinischen Fakultät der Universität Innsbruck setzte ich mein Studium an der FU-Berlin fort und bestand dort am 28.3.1969 die ärztliche Prüfung.

Nach Ableistung der Medizinalassistentenzeit erhielt ich am 2.11.1970 die Bestallung als Arzt. Seit dem 1.11.1970 bin ich als Assistent an der Anaesthesie-Abteilung des Städt. Wenckebach-Krankenhauses tätig.

